

Effetti della radiazione RF a 900 MHz sulla regolazione di elementi ripetuti in *Drosophila melanogaster*

V. Specchia, L. Giordano, M.P. Bozzetti*

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Laboratorio di Genetica - Università del Salento, Via Provinciale Lecce-Monteroni, C.P. 193, 73100 Lecce, Italy

V. Nassisi, D. Delle Side

Dipartimento di Fisica, Laboratorio di Elettronica Applicata e Strumentazione, LEAS
Università del Salento, Via provinciale Lecce-Arnesano, C.P. 193, 73100 Lecce, Italy

* corresponding author:

Abstract

L'analisi dell'attivazione delle sequenze ripetute è stata condotta a seguito di un innovativo stato di stress in *Drosophila melanogaster*, un organismo eucariotico. Una specifica linea di trasmissione è stata sviluppata per indurre una nuova forma di stress in organismi viventi senza alterarne le funzioni vitali. In questo lavoro sono stati analizzati degli individui di *Drosophila melanogaster*, mantenuti alla frequenza di 900 MHz per alcuni giorni. Lo studio ha permesso di stabilire che lo stress ha causato il mancato silenziamento di elementi ripetuti. In particolare l'azione di un campo di decine di V/m per 5 giorni ha prodotto la comparsa di cristalli costituiti dalla proteina di Stellate, che sono un sintomo chiaro del mancato silenziamento di sequenze ripetute.

INTRODUZIONE

In tutti i genomi, in particolare quelli eucariotici, sono presenti particolari elementi ripetuti; questi elementi sono stati denominati elementi genetici trasponibili o trasposoni [1,2,3]. Gli organismi hanno sviluppato dei sistemi regolativi di "silenziamento" dei trasposoni e di elementi ripetuti in genere, necessari a garantire la stabilità e l'integrità dei genomi [4]. In particolare tali regolazioni, che si sono conservate nel corso dell'evoluzione, sono presenti nei tessuti germinali in cui, mutazioni causate dalla trasposizione, cioè dall'attività degli elementi trasponibili, possono essere trasmesse alla progenie e risultare deleterie per l'organismo che le porta [5]. Studi condotti nell'ultimo decennio hanno iniziato a chiarire i meccanismi molecolari alla base del silenziamento dei

trasposoni e di altre sequenze ripetute. Un elemento chiave di questa regolazione è una specifica classe di piccole molecole di RNA: i piRNA che, con la collaborazione di specifiche proteine, intervengono in tale meccanismo chiamato "RNA interferenza" [6].

Nel 2010 il gruppo di ricerca del Laboratorio di Genetica del DiSteBA-Università del Salento ha dimostrato, che la proteina HSP90 di *Drosophila melanogaster*, è coinvolta nel silenziamento dei trasposoni. Quando l'HSP90 è ridotta o mancante, a causa dell'uso di una sostanza che ne inibisce l'attività, oppure perché si è in presenza di mutazioni del gene che la codifica, si verifica un'attivazione degli elementi genetici trasponibili. In particolare è stata rilevata un'espressione notevolmente aumentata di tutte le classi di trasposoni nei tessuti germinali ed è stato dimostrato che a questo incremento corrisponde un effettivo cambiamento di posizione di questi elementi nel genoma. E' stato anche dimostrato che il movimento degli elementi trasponibili (in particolare quello che avviene nelle cellule germinali) può determinare l'insorgenza di mutazioni morfologiche *ex novo* [7].

HSP90 è una proteina appartenente alle "heat shock protein", e rappresenta quindi un collegamento molto stretto tra stress e silenziamento di elementi genetici trasponibili. E' stato osservato da tempo che gli stress ambientali inducono l'attività degli elementi trasponibili in vari organismi e questo rappresenta un legame fondamentale tra i fattori ambientali e le variazioni dei genomi [3,8]. Infatti, il risultato del movimento degli elementi trasponibili, è la possibile insorgenza di "nuove" mutazioni geniche dovute proprio all'inserzione di questi elementi mobili.

E' già noto l'effetto dello stress di temperatura ("heat shock") che determina movimento di elementi trasponibili [3, 9]. Abbiamo voluto verificare se un

diverso tipo di stress, come le onde elettromagnetiche (EM) nel range della radiofrequenza (RF), potessero determinare effetti simili sugli elementi trasponibili e in generale sulle sequenze ripetute.

Recentemente l'uso delle RF ha dimostrato una risposta sugli organismi viventi modificando la velocità di mutazione [10,11].

Per determinare il mancato silenziamento di elementi ripetuti, dovuto a condizioni di stress, abbiamo a disposizione uno strumento molto rapido ed efficace che consiste nella determinazione della presenza di formazioni cristalline specifiche negli spermatozoi di mosche. Queste formazioni cristalline sono il risultato della mancata regolazione delle sequenze *crystal-Stellate* che sono sequenze ripetute specifiche, presenti nel genoma di *Drosophila melanogaster*: Il mancato silenziamento delle sequenze *Stellate*, che in condizioni normali avviene ad opera delle sequenze *crystal*, determina l'attivazione dell'espressione delle sequenze *Stellate*, nei tessuti germinali maschili, ciò determina la produzione di una proteina specifica, la proteina *Stellate*, che è il componente principale dei "cristalli" [12].

APPARATO SPERIMENTALE PER INDURRE STRESS

L'idea innovativa per indurre un nuovo stato di stress è stata di utilizzare la radiazione elettromagnetica nel range delle radiofrequenze, essendo alla stato attuale quella più diffusa per l'uso della telefonia mobile. Allo scopo è stata costruita una linea di trasmissione per permettere di controllare il campo interagente con i nostri campioni. Il generatore RF è un RHODE & SCHWARZ SM. La sua frequenza massima è di 3 GHz e la potenza di uscita 20 mW. L'impedenza caratteristica, e quindi la resistenza d'uscita, è di 50 Ω. Al fine di limitare gli effetti di disadattamento e controllare il campo, la linea è stata realizzata con due conduttori piani di lunghezza $l = 15\text{ cm}$ e larghezza $a = 10\text{ cm}$, separati da 4 supporti in PVC di spessore $h = 2\text{ cm}$. Teoricamente la, lunghezza della linea non influenza l'impedenza caratteristica essendo espressa dalla seguente formula:

$$R_0 = \sqrt{\frac{L}{C}} = \sqrt{\frac{\mu_0}{\epsilon_0} \frac{h}{l}} \quad (1)$$

dove si è escluso l'irraggiamento esterno e indicato con ϵ_0 e μ_0 rispettivamente la permittività elettrica e la permeabilità magnetica.

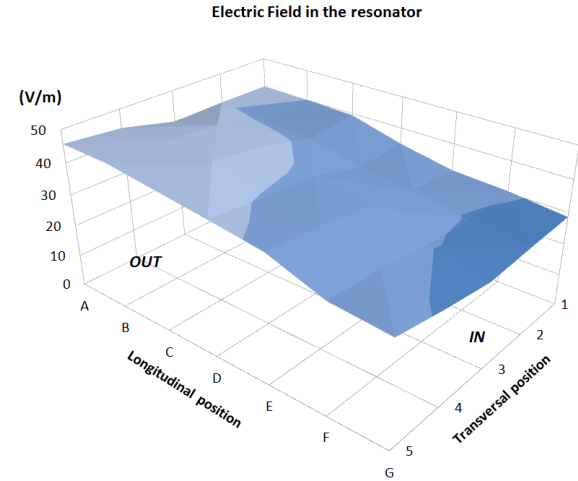


Fig. 1. Mappa indicante la distribuzione del campo elettrico all'interno della linea a 900 MHz.

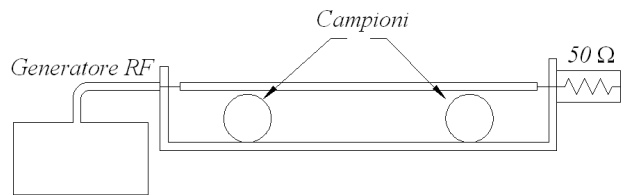


Fig. 2. Schema del set up sperimentale.

Chiudendo la linea su un carico di 50 W il campo al suo interno è misto, cioè composto da un'onda progressiva ed un'onda stazionaria, come si può vedere dalla Fig. 1[13].

La mappatura del campo riporta un campo intenso di 65 V/m sul lato input della linea ed un campo di 85 V/m sul lato out.

Per meglio comprendere il funzionamento riportiamo in Fig. 2 il set up sperimentale

La RF utilizzata, intensità, frequenza e durata, non influenza la temperatura dei campioni sottoposti ad irraggiamento. Monitoraggi condotti con sonde termiche (Pt-RTD 100Ω) su campioni d'acqua non hanno riscontrato rilevanti variazioni di temperatura.

MATERIALI e METODI

Materiali:

10-15 *Drosophila* giovani (di due o tre giorni) di un ceppo selvatico (*Oregon-R*) sono state introdotte in barattoli contenenti il mezzo di coltura in cui normalmente si sviluppano, costituito da: polenta di mais, agar, zucchero e lievito.

Metodi:

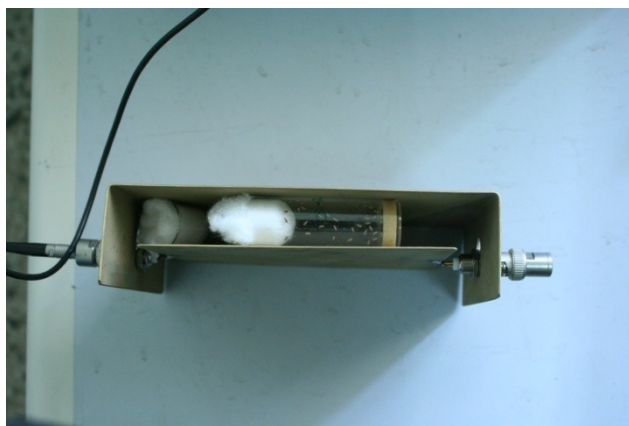


Fig. 3. Foto della linea di trasmissione con due barattoli contenenti le mosche

Preparazione dei testicoli e immunocolorazione con anticorpo anti-Stellate

La preparazione degli spermatociti si ottiene dissezionando, in una goccia di TESTIS BUFFER (TIT : KCl 183 mM, NaCl 47 mM, Tris Hcl 10 mM), maschi adulti, giovani. Una coppia di testicoli è trasferita su un vetrino coprioggetto contenente 3 o 4 ml di TIT. si lascia aderire al coprioggetto un portaoggetto. I vetrini così preparati sono congelati velocemente in azoto liquido e fissati in metanolo 5' a -20 °C, quindi si pongono 1' in acetone a temperatura ambiente. Si procede ad una fase di lavaggio per 10' in una soluzione 0.5% di acido acetico, 1% di Triton X-100 in PBS (1x), quindi si passano i vetrini per 3 tre volte per 5', in PBS 1x (per 100 ml: 8 gr NaCl, 0,2 gr Kcl, 1,1 Na₂HPO₄, 0,2 gr KH₂PO₄). I vetrini così trattati sono incubati con l'anticorpo anti-STE primario ottenuto in topo, diluito 1:80 in una soluzione di PBS e 1% BSA (Bovin serum albumin), per 1h a temperatura ambiente in PBS 1x, quindi si incuba con anticorpo secondario, anti immunoglobulina di topo, per 1h a temperatura ambiente al buio in camera umida e si lava in PBS 1x.

I vetrini sono colorati con una soluzione di DAPI (4,6-Diammino-2-fenilindolo), per 3', quindi si lava 1 volta in PBS e si procede a montare i vetrini. I vetrini così preparati possono ora essere osservati al microscopio a fluorescenza. Le immagini possono essere acquisite tramite CCD camera.

soluzione di DAPI (4,6-Diammino-2-fenilindolo), per 3', quindi si lava 1 volta in PBS e si procede a montare i vetrini. I vetrini così preparati possono ora essere osservati al microscopio a fluorescenza. Le immagini possono essere acquisite tramite una CCD camera.

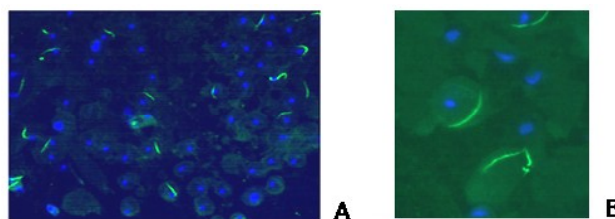


Fig. 4. Spermatociti da maschi di *Drosophila melanogaster* del ceppo *Oregon-R*, sottoposti all'azione della RF osservati ad un ingrandimento 20x A) e ad un ingrandimento 40x B).

RISULTATI

Trascorsi 5 giorni dell'esperimento, i moscerini sono stati sottoposti a dissezione per ottenere i testicoli, che sono stati successivamente schiacciati, fissati e colorati con l'anticorpo specifico, prodotto nel nostro laboratorio, contro la proteina Stellate.

L'analisi al microscopio a fluorescenza dei tessuti in esame, ottenuti da moscerini sottoposti all'azione della RF di 900 MHz, ha rivelato la presenza delle inequivocabili formazioni cristalline costituite dalla proteina di Stellate, evidenziate dalla fluorescenza dovuta ad un fluorocromo (FITC, fluoroisotiocianato di fluoresceina) che rende evidenti le regioni specifiche del tessuto in cui è presente la proteina di Stellate Fig. 4.

Queste formazioni non sono state riscontrate nei campioni di controllo.

CONCLUSIONI

Lo studio, pur se preliminare, dimostra che le RF a 900MHz, a cui i moscerini sono stati sottoposti, sono in grado di alterare la regolazione del silenziamento delle sequenze ripetute, di cui le sequenze Stellate sono emblematiche. Se confermato ed esteso all'analisi di altre sequenze ripetute (gli elementi trasponibili), in altri ceppi ed anche in tessuti somatici, questo dato sarebbe molto importante per chiarire gli effetti di questo tipo di stress sia sulla regolazione mediata dai piRNA, necessaria agli organismi per mantenere la stabilità dei loro genomi e sia sull'insorgenza di mutazioni che potrebbero avere effetti anche gravi sull'organismo in cui si verificano.

RIFERIMENTI

- [1] B. McClintock *Science* 226: 792-801 (1984).
- [2] S. Pimpinelli, M. Berloco, L. Fanti, P. Dimitri, S. Bo-

- naccorsi, E. Marchetti, R. Caizzi, C. Caggese and M. Gatti *PNAS* 92: 3804-3808 (1995)
- [3] E.S. Lander *Nature* 470, 167-197 (2011).
- [4] M.C. Siomi, K. Sato, D. Pezic, AA. Aravin *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 246-258 (2011)
- [5] H. L. Levin and J. V. Moran *Nat Rev Genet.* 12,; 615–627 (2011)
- [6] Ghildiyal, M. and Zamore, P.D. *Nature Reviews Genetics* 10: 94-108 (2009)
- [7] V. Specchia, L. Piacentini, P. Tritto, L. Fanti, R. Dalesandro, G. Palumbo, Pimpinelli S. and M.P. Bozzetti *Nature* 463: 662-665 (2010)
- [8] P. Capy, G. Gasperi, C. Biemont, and C. Bazin *Heredity* 85, 101–106 (2000)
- [9] C. Vieira, P. Aubry, D. Lepetit and C. Biemont *Proc. Biol. Sci.* 265: 1161–1165 (1998).
- [10] F. Belloni, D. Doria, A. Lorusso, V. Nassisi, L. Velardi, P. Alifano, C. Monaco, A. Talà, M. Tredici and A. Rainò, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 39, 2856-2861 (2006)
- [11] F. Belloni, et al. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 39, 2856-2861(2006)
- [12] M.P. Bozzetti, S. Massari, P. Finelli, F. Meggio, L.A. Pinna, B. Boldyreff. O.G. Issinger, G. Palumbo, C. Ciriaco, S. Bonaccorsi and S. Pimpinelli *PNAS* 92: 6067-6071 (1995)
- [13] V. Nassisi, P. Alifano, A. Talà and L. Velardi, *J. Appl. Phys.* (sottomesso)